第5卷 第3期　　动 物 学 研 究　　Vol. 5, No. 3
1984年 8月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Aug., 1984

丙线照射所致人血淋巴细胞与中国仓鼠卵巢成纤维细胞DNA单链断裂及其修复的观察

胡 斌　卓爱娣　胡维先*　陈月能　夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所　北京)

摘　　要

用微孔滤膜碱洗脱法观察了丙线照射引起人血淋巴细胞（D_0为400拉德）及中国仓鼠卵巢成纤维细胞（D_0为200拉德）的DNA单链断裂及其修复。在0～3000拉德范围内，两种细胞DNA单链断裂的程度基本一致，照射剂量与单链断裂的对数之间呈直线相关。800、1500及3000拉德照射后，经过0.5～7小时的孵育，中国仓鼠卵巢成纤维细胞DNA单链断裂的修复优于人血淋巴细胞，说明这两种细胞辐射敏感性与DNA单链断裂修复能力无关。

近十余年来，人们对于电离辐射所致DNA的分子结构损伤、修复及其生物学意义产生了广泛的兴趣，其中研究得最多的为DNA单链断裂及其修复。在噬菌体上，单链断裂与噬菌体失活存在一定关系（Huttermann等，1978）。但在细菌与哺乳动物细胞上，这种损伤与细胞死亡的关系如何，看法上还存在分歧。用辐射敏感性不同的细胞，经不同剂量的丙线照射后，对其DNA单链断裂的修复进行动态观察，可能有助于问题的澄清。为此，我们用膜过滤碱洗脱法对辐射敏感性不同的两种细胞，即离体人血淋巴细胞(HL)和中国仓鼠卵巢成纤维细胞（CHO）的DNA单链断裂及其修复情况进行了比较观察。

材 料 及 方 法

(一) 细胞的分离、培养及放射性同位素标记

淋巴细胞的分离与培养按我们实验室常规方法进行(胡斌等，1983)，其简要步骤如下：用比重1.077的聚蔗糖——泛影葡胺液从正常成人新鲜血液中分离淋巴细胞，纯度约

* 成都军区医学研究所。

本文1982年10月29日收到，1983年7月15日收到修改稿。

为93%。悬浮在含20%小牛血清的RPMI 1640培养液中，在PHA刺激下，37°C培养84小时。在结束培养前18小时加入^{3}H-TdR(比度为25Ci/m*M*)，每毫升细胞悬液加入0.4μCi。收获的淋巴细胞用Hanks液洗涤后，加入新鲜的1640液，每毫升含细胞5～8×10^{5}个。

中国仓鼠卵巢成纤维细胞，用含10%小牛血清的Eagle氏培养液单层贴壁培养，当细胞处于指数生长期，加入^{3}H-TdR进行标记，每毫升培养液加入0.3μCi。再培养18—20小时后，用胰蛋白酶处理，再用Hanks液洗涤，将细胞悬浮于Eagle氏培养液，每毫升含有5～8×10^{5}个细胞。

（二）照射及照后修复

细胞悬液分装于试管中，每管1毫升。于照射前40分钟浸入冰水中，照射在冰水中进行。照射源为^{60}钴，照射源与试管距离30公分，剂量率为790拉德/分。照射后细胞继续保持在0°C，直到分析。用于观察修复的细胞，照射后放于含小牛血清的新鲜培养液中，在37°C温箱中孵育到所需的时间，取出置于冰水中保存，等待分析。

（三）单链断裂的检测

采用简化的Kohn等（1976）的碱洗脱法(章扬培等，1983)。主要步骤如下：将1毫升细胞悬液（含5～8×10^{5}个细胞）转移到直径为25毫米、孔径为1.2微米的醋酸纤维微孔滤膜上，用冷的pH7.6磷酸缓冲液洗两次。室温下加入pH10(含Triton X—100)的细胞溶破液10毫升，抽滤除去，再用pH10的10^{-3}*M* Na_2EDTA液5毫升洗一次。然后加入pH12.3的四丁基氢氧化铵——Na_2EDTA碱性洗脱液13毫升，用蠕动泵抽滤。流速控制在每分钟约0.4毫升，待洗脱液抽滤完毕后，取滤液1毫升（复管）供液体闪烁计数用。取下滤膜，加0.4*N* HCl 0.4毫升，置70°C水浴中30分钟，冷却后加入0.3*N*四丁基氢氧化铵0.6毫升。滤液和滤膜管各加入闪烁液6毫升，放暗处2小时后，在LKB RACKBETA 1215型液体闪烁计数器上计数。以残留在滤膜上的放射性除以总放射性，其商称为膜上DNA残留率，数值的高低代表DNA单链断裂的程度。

（四）细胞计数及细胞存活的检查

HL和CHO细胞的培养和照射按（一）、（二）的步骤进行，每毫升细胞数为8～10×10^5。分别照射1500及3000拉德后，放37°C温箱中孵育1～7小时，定期取出计数和检查细胞存活情况：取细胞悬液0.2毫升，用0.1*N* HCl稀释4倍，在显微镜下计数；另取细胞悬液4滴，加1%苔酚兰1滴，室温下放置3～5分钟，显微镜下数500个细胞，计算着色细胞（死亡细胞）的百分率。

实 验 结 果

（一）HL和CHO细胞的DNA单链断裂与照射剂量的关系

两种细胞照射100～3000拉德后，DNA单链断裂的情况见图1（图中每一点为4～8个数据的平均值）。照射前HL及CHO细胞的滤膜上DNA残留率分别为92.1%和91.2%。经丙线照射后，随照射剂量的增加，膜上残留率逐渐降低。3000拉德照射后，两种细胞的膜上DNA残留率分别为16.2%和16.3%，基本相同。在其余的各个观察点，两种细胞的数值也很接近。经统计处理，照射剂量与膜上DNA残留率的对数之间呈

直线相关，其回归方程为：

$$HL_{(a)}: 100Lg\ Y = -0.5782 - 0.0254X$$

$$CHO: 100Lg\ Y = -0.3008 - 0.0255X$$

其相关系数分别为－0.996和－0.995。两条曲线的斜率比为1.001，即两条曲线几乎重叠，说明在HL和CHO细胞的DNA链上造成一个单链断裂所需要的能量相同。

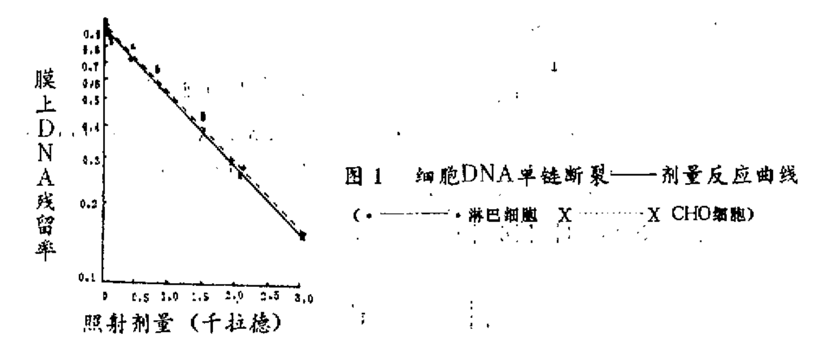


图1　细胞DNA单链断裂——剂量反应曲线
（•——•淋巴细胞　X……X CHO细胞）

（二）DNA单链断裂后的修复

HL及CHO细胞经800、1500及3000拉德照射后，置于37°C保温不同时间，DNA单链断裂的修复情况见图2。我们可以看到，两种细胞都能迅速出现修复，但修复能力有所不同。CHO细胞经三种剂量照射后保温1～2小时，其膜上DNA残留率均恢复或接近照前水平，持续观察至7小时，膜上残留率仅略有降低。而HL细胞只有800拉德照射者，保温1小时后的膜上残留率接近照前水平，其余两种较大剂量照射者未能恢复到照前水平，且HL细胞在一度恢复后，紧接着膜上DNA残留率又逐步降低，说明已修复的DNA链再次出现断裂或降解。因此，总的看来，HL细胞DNA单链断裂的修复能力低于CHO细胞。

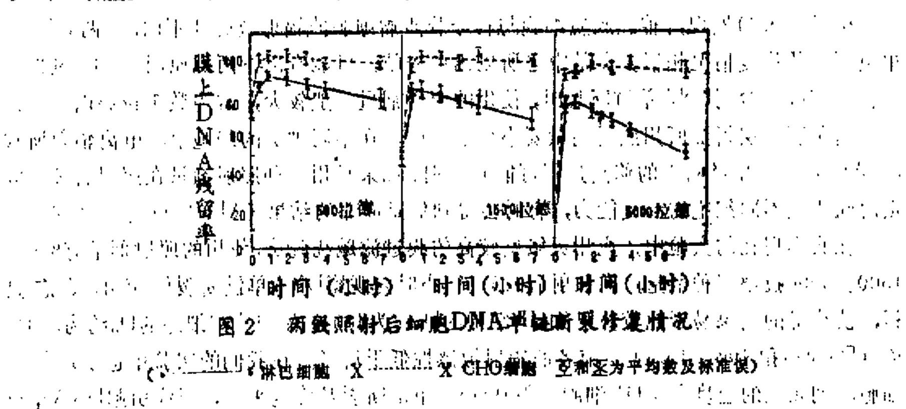


图2　丙线照射后细胞DNA单链断裂修复情况
（•——•淋巴细胞　X……X CHO细胞　$\bar{x}$和$\bar{x}$为平均数及标准误）

（三）照射后细胞的间期死亡

1500及3000拉德丙线照射后，两种细胞放在37°C孵育，每隔1小时各取一管细胞进行检查。我们发现HL及CHO细胞照后很快出现死亡，7小时内细胞死亡率迅速增加。

此后则渐趋缓慢，因此，我们主要观察了两种细胞照后7小时内的死亡率。实验结果见图3。从图中可以看到，1500及3000拉德照射后的各个观察点，CHO细胞的死亡率皆明显高于HL细胞，如1500拉德照后7小时，HL及CHO细胞的死亡率分别为17%和47%，3000拉德照射者分别为28%和51%。

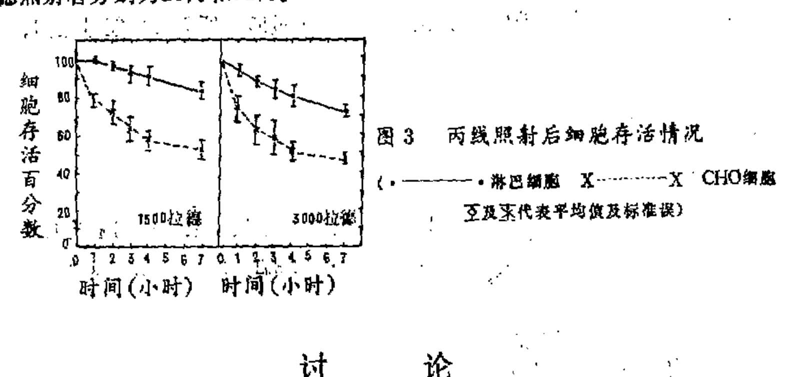


图3 丙线照射后细胞存活情况

(·———·淋巴细胞 X·········X CHO细胞 $\bar{X}$及$S\bar{X}$代表平均值及标准误)

讨 论

电离辐射造成细胞死亡的生化机理，到目前为止还没有明确的结论。一般认为，DNA的损伤是一个重要因素。但DNA单链断裂及其修复在细胞死亡上起到什么作用，文献中意见分歧。Mc Grath和Williams (1966) 第一个应用碱性蔗糖密度梯度离心法检测DNA单链断裂。他们发现对射线敏感的大肠杆菌Bs-1株，其修复单链断裂的能力远远低于对射线有抵抗力的B/r株。其后Epstein等 (1974)、Körner等 (1977) 和Koval等 (1979) 应用类似的方法在原核和真核细胞中也发现此种现象，从而引起学者们很大的注意，认为修复DNA单链断裂能力的大小与细胞辐射敏感性密切相关。但近来另一些作者(Hesslewood, 1978; Ahnström 等，1978; Nilsson 等，1981)用羟基磷灰石柱层析法进行研究，发现细胞的辐射敏感性与DNA单链断裂的修复能力之间并无明显关系。如Nilsson等(1981)发现，神经胶质细胞与神经胶质瘤细胞的辐射敏感性不同，而两者DNA单链断裂的修复情况相似。文献中之所以出现分歧，可能有以下两点原因：(1)碱性蔗糖梯度离心法检测DNA单链断裂时，使用的照射剂量一般较大，常为数千拉德以上，而羟基磷灰石柱层析法所用照射剂量要小得多。(2)在不同种类的细胞中，电离辐射所致DNA的降解及单链断裂的修复过程可能有差别。如果只用一种照射剂量在照射后某一固定时间比较不同细胞的修复能力，有时会得到似是而非的结果 (Ahnström等，1978)。

在我们现在的实验中，应用灵敏度较高的膜过滤碱洗脱法，使用的照射剂量有800、1500及3000拉德三种剂量，在照射后0.5～7小时内观察DNA单链断裂修复的动态过程，使获得的结果易于比较。已知HL细胞的D_0约为400拉德，CHO细胞的D_0约为200拉德 (Duncan和Nias，1977)。前者的辐射敏感性低于后者。在我们的实验中也发现CHO细胞间期死亡的速度大于HL细胞。但从DNA单链断裂及修复来看，射线引起DNA单链断裂的程度，两种细胞间没有差别，而CHO细胞单链断裂的修复能力优于HL细胞，说明这两种细胞的辐射敏感性与DNA断裂单链的修复能力无关。各种细胞辐射敏感性不同的原因，还要从其它途径进行探讨。

参 考 文 献

胡斌　陈月龍　卓爱娣　王利军　1983　γ线照射引起人外周血淋巴细胞DNA单链断裂及其重接过程的研究。中华放射医学与防护学杂志 2(3):26—27。

章扬培　徐惠英　夏寿萱　1983　用膜过滤法观察γ线引起的中国仓鼠卵巢细胞DNA单链断裂及其修复。中华放射医学与防护学杂志（印刷中）。

Ahnstrom, G., A. M. George and W. A. Cramp 1978 Extensive and equivalent repair in both radiation-resistant and radiation-sensitive E. coli determined by a DNA unwinding. *Int. J. Radiat. Biol.* 34:317—327.

Duncan, W. and A. H. W. Nias 1977 Clinical Radiobiology. Churchill Livingstone. 53—68.

Epstein, J., J. R. Williams and J. B. Little. 1974 Rate of DNA repair in progeric and normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:850—857.

Hesslewood, I. P. 1978 DNA strand break in resistant and sensitive murine lymphoma cells detected by the hydroxyapatite chromatographic technique. *Int. J. Radiat. Biol.* 34:461—469.

Huttermann, J., W. Kohnlein and R. Teoule 1978 Effects of Ionizing Radiation on DNA. Springer-Verlag. 272—277.

Kohn, K. W., L. C. Erickson, R. A. G. Ewig and C. A. Friedman 1976 Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry,* 15:4629—4637.

Körner, I., M. Walicka, W. Malz and J. Z. Beer 1977 DNA repair in two L5178Y cell lines with different X-ray sensitivities. *Studia Biophysica* 61:141—149.

Koval, T. M., R. W. Hart, W. C. Myser and W. F. Hink 1979 DNA single-strand break repair in cultured insect and mammalian cells after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 35:183—188.

McGrath, R. A. and R. W. Williams 1966 Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid, the rejoining of broken pieces. *Nature* (London), 212:534—535.

Nilsson, S. and L. Johansson 1981 Induction and repair of DNA strand breaks in human cell lines with different radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 39:107—112.

THE OBSERVATION OF γ-RAY INDUCED DNA SINGLE STRAND BREAKS AND THEIR REJOINING IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS AND HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Hu Bin, Zhuo Aidi, Hu Weixian
Chen Yueneng, Xia Shouxuan
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

The induction and rejoining kinetics of DNA single strand breaks in irradiated human peripheral lymphocytes ($D_0=400$ rads) and Chinese hamster ovary cells (CHO) ($D_0=200$ rads) were studied by alkaline elution method. Although the radiosensitivity of these two types of mammalian cells is different, the extent of single strand breakage is approximately the same within the range of 100—3000 rads. The ability to rejoin the single strand breaks in the more radiosensitive CHO cells is greater than that in lymphocytes. It appears that there is no direct relationship between the efficiency of rejoining of single strand break and radiosensitivity in these two types of cells.